# Das Tyrosinase-Reagens als Mittel zur Feststellung des Grades der Eiweißzersetzung durch Bakterien.

Von **Alice Breslauer.**

(Aus dem botanischen Institut der Universität Genf.)

Die Wirkung der Bakterien auf Eiweißsubstanzen ist äußerst komplizierter Natur; sie wird ausgeübt mit Hilfe besonderer Stoffe, die teils im Innern der Zelle eingeschlossen sind und erst durch deren Zerstörung in Freiheit gesetzt werden, teils in Form von Sekretionen auftreten, ähnlich denjenigen der spezifischen Fermente, welche von Drüsenzellen produziert werden (Speichel, Pankreassaft), oder schließlich die Zerstörung der organischen Substanz im Innern der Zelle bewirken. Welcher Art auch die Aktion dieser Vernichter der organischen Materie sei, so führt der Zersetzungsprozess, dessen Phasen oft zum großen Teil verdeckt bleiben, zu einer Reihe von Endprodukten, deren chemische Struktur bisweilen sehr einfach, manchmal auch sehr kompliziert ist. So nimmt man z. B. an, daß die sukzessiven Stadien der Peptolyse: Albumosen, Peptone, Polypeptide, Peptide und Aminosäuren die Produkte eines mehr oder weniger vollständigen Zerfalls der Proteinstoffe sind, welcher nach den Frgebnissen der neueren Untersuchungen der Wirkung der proteolytischen Enzyme zuzuschreiben ist. Die Gegenwart dieser Enzyme bei den Mikroorganismen — die man seit langem geahnt hat — ist auf sichere Art von Bitter[1]) festgestellt worden, der als erster den Beweis erbracht hat, daß durch Hitze abgetötetes Spirillum cholerae stark Gelatine verflüssigte.

Senger, Jerosch, Rietsch und Sternberg[2]) vervollständigten diese Untersuchungen, indem sie zeigten, daß anderen sogenannten „verflüssigenden Bakterien" die gleiche Eigenschaft zukam. Sie stellten

[1]) Bitter, Archiv für Hygiene, 5, 1886.

[2]) Sternberg, Baumgartens Jahresbericht, 1887.

auch teilweise das Ferment durch direkte Fällung mittels Alkohols dar. Gründlichere Experimente von Fermi[1]), dem es gelang, die lebenden Organismen mittels Sublimat, Phenol, Salizylsäure oder durch Filtration über poröse Körper abzutöten, führten zum gleichen Ergebnis. Ohne hier auf die technischen Details seiner Arbeiten einzugehen, wollen wir nur kurz erwähnen, daß es ihm auf diese Weise gelang, ziemlich wirksame Enzyme von Micrococcus asciformis, Bacillus prodigiosus, Bacillus subtilis, Bacillus ramosus, Bacillus megatherium, Bacillus pyocyaneus darzustellen.

Zur Feststellung der proteolytischen Kraft der Enzyme wandte Fermi für gewöhnlich eine gesättigte, wässerige Thymollösung mit 7 % Gelatine an. Er isolierte ferner die Enzyme aus dem Gelatine-Milieu, indem er zuerst den größten Teil der beigemischten Substanzen durch verdünnten Alkohol ausfällte und hierauf durch absoluten Alkohol das Enzym zur Abscheidung brachte.

Auf Grund seiner Resultate gelangte dieser Forscher zur Überzeugung, daß die Wirkung der Bakterien auf die Eiweißstoffe in Analogie mit ihrer verschiedenen Empfindlichkeit gegenüber schädlichen äußeren Faktoren, wie hohe Temperatur, Säuren und Gifte, große Unterschiede aufweist. In dieser Hinsicht müßten die Bakterienenzyme nach Fermi weit eher dem Pepsin, wie dem Trypsin an die Seite gestellt werden, und ihre Aktion würde sich auf eine Umwandlung der Albumine in lösliche Substanzen beschränken.

Die Gelehrten, die sich nach Fermi mit den proteolytischen Enzymen der Mikroorganismen beschäftigt haben, wandten ihr Interesse besonders dem Problem der Lösung zu und ließen gewöhnlich die Produkte dieser Lösung ganz außer acht. So verdanken wir Eickmann[2]) in seiner „Plattenmethode“ ein einfaches Mittel zur Feststellung der Anwesenheit proteolytischer Enzyme. — Eickmann ging übrigens noch einen Schritt weiter, indem er Elastin in Bouillonkulturen des Bacillus pyocyaneus löste, aus denen er vorher die Bakterien durch Filtration entfernt hatte.

Analoge Untersuchungen, die zum Gegenstande das Fibrin und den Bacillus fluorescens liquefaciens hatten, sind auf qualitative Art und unter genau festgesetzten Temperaturbedingungen durch Emmerling[3]) ausgeführt worden.

---

[1]) Fermi, Archiv für Hygiene, **10**, **12**, **14**.

[2]) Eickmann, Centralbl. f. Bakt. **29**, 1901, 22.

[3]) Emmerling, Berichte d. D. chem. Gesellsch., 1902, 700.

Wenn man auch die Resultate Emmerlings nur mit Vorbehalt akzeptieren kann, so muß man andererseits bedingungslos die grundlegenden Arbeiten Duclaux'[1]) und auch diejenigen Kalischers[2]) über die Resorption des Kaseins durch besondere Milchbakterien anerkennen. Er gebrauchte für seine Experimente ältere, durch Chamberlandfilter filtrierte Kulturen, oder durch Papier filtrierte Bouillon unter Zusatz von Thymol oder Toluol.

Indem er eine genügend große Menge Enzym anwandte, konnte er nicht nur das ganze Kasein in Pepton verwandeln, sondern auch das Pepton weiter zersetzen und die Bildung von Leucin, Tyrosin und der Oxyaminosäuren nachweisen.

Cacace[3]), der sich mit Sarcina aurantiaca, Bacillus anthracis und Staphylococcus pyogenes aureus beschäftigt hat, konnte zeigen, daß diese Bakterien Eiweiß auf die gleiche Art zersetzen, wie die Verdauungsfermente, u. zw. unter Bildung von Proto- und Deuteroalbumosen und Spuren von Peptonen.

Wir haben die Frage von einem anderen Gesichtspunkte aus ins Auge gefaßt und in einem ersten Teile unserer Arbeit einzig und allein die Zersetzungsprodukte der Proteinstoffe unter der Einwirkung der verschiedenen Mikroorganismen untersucht, indem wir als Maßstab der proteolytischen Kraft den Grad der Peptolyse festgesetzt haben. Es ist bekannt, daß — Gleichheit des Nährbodens und aller äußeren Faktoren vorausgesetzt — gewisse Bakterienarten sehr schnell und bis zu Aminosäuren die Eiweißsubstanz zerstören, andere dagegen das Peptonstadium nicht überschreiten können. Unsere Experimente sind im hohen Grade durch Anwendung eines neuen Reagens vereinfacht worden, welches vor einigen Jahren durch R. Chodat[4]) entdeckt und in einer seiner letzten Arbeiten eingehend beschrieben worden ist.

Im Jahre 1907 hat Chodat das überaus charakteristische Verhalten der Tyrosinase zu tyrosinhaltigen Peptiden entdeckt und gezeigt, daß der Zusatz einer Aminosäure eine große Rolle bei dieser Reaktion spielt.

---

[1]) Duclaux, Mémoires sur le lait. Ann. de l'Institut nat. agronomique, 1882; Le lait., Paris 1894. — Traité de microbiologie. Paris, 1899. II, 610.

[2]) Kalischer, Archiv f. Hygiene, **37**, 1900, 48.

[3]) Cacace, Centralbl. f. Bakt., **30**, 1901, 244.

[4]) R. Chodat, Nouvelles recherches sur les ferm. oxydants, Archives Sc. phys. et naturelles IV, t. XXIV, 1907; t. XXXII, 1911; auch in Zunz Methoden zur Untersuchung der Verdauungsprodukte und in Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden VI, 1912, 513.

Indem er diese Reaktion auf Phenole, und im speziellen auf p-Kresol ausdehnte, gab er uns ein wertvolles Mittel an die Hand, den Gang der Eiweißverdauung Schritt für Schritt zu verfolgen[1]).

Da die Reinheit des Fermentes für die Beurteilung der Ergebnisse von ausschlaggebender Bedeutung ist, haben wir für unsere Versuche ausschließlich die aus Solanum tuberosum dargestellte und nach der von Chodat angegebenen Methode sorgfältigst gereinigte Tyrosinase verwandt. Wir geben hier die Einzelheiten des Verfahrens wieder, da es uns gelungen ist, die durch den Verfasser angegebene Ausbeute zu verdoppeln: 6 kg 400 g Kartoffelschalen wurden in einer Hackmaschine zerkleinert und die Masse mit 2 Liter 95prozentigem Alkohol 24 Stunden lang digeriert. Nach dem Auspressen des Ganzen erhielt man 5 kg 300 g — 5 kg 400 g einer braunen Flüssigkeit, welche man in 6 Liter 95prozentigen Alkohol einfließen ließ. Es bildet sich hierbei eine reichliche Menge Niederschlag, den man auf einem Filter sammelt. Man ließ die Hauptmenge der beigemengten Flüssigkeit abtropfen, löste den noch feuchten Niederschlag vom Filter und verrieb ihn in einem Porzellanmörser mit 300 g destilliertem Wasser. Nach gründlichem Durchmischen und 3—4stündigem Stehenlassen erhielt man durch Filtration 300 ccm einer Flüssigkeit, aus welcher man mittels der dreifachen Menge absoluten Alkohols das Ferment in Form eines Niederschlages ausfällte, welcher mehrmals mit Alkohol dekantiert, auf einem Filter gesammelt und erst an der Luft bis zum Verdunsten des Alkohols und hierauf im Exsikkator getrocknet wurde. Die Ausbeute wechselt je nach Qualität der verwandten Kartoffeln und steigt bis auf 4,35 g. Das erhaltene Pulver ist hellbraun; es löst sich leicht im Wasser mit brauner Farbe.

Auf die beschriebene Art gereinige Tyrosinase gibt mit p-Kresol eine sehr charakteristische Gelbfärbung, die — falls das Ferment in genügender Konzentration vorhanden ist — nach 24 Stunden orangegelb wird. Die meisten Aminosäuren, wie das Glykokoll, das Leucin, das Phenylalanin geben mit äquimolekularen Mengen p-Kresol und Tyrosinase eine Rotfärbung, welche bei Gegenwart eines Überschusses der Aminosäure mehr oder weniger schnell in blau übergeht. Das Glycyltyrosin und eine größere Anzahl anderer Polypeptide reagieren weniger lebhaft mit p-Kresol-Tyrosinase, die rote Farbe geht nur allmählich in blaue über. Gewisse andere Polypeptide wie z. B. Diglycylglycin geben Rotfärbungen mit Übergang in Gentianblau.

---

[1]) Siehe auch R. Chodat und K. Schweizer, Über die desamidierende Wirkung der Tyrosinase. Biochemische Zeitschrift Bd. 57, 430.

Mit den Proteinen, ebenso wie den Peptiden kann man nicht über das erste Stadium dieser Farbenreaktion hinausgehen.

In der oben geschilderten Reaktion hatten wir also ein ausgezeichnetes Mittel zur Unterscheidung der mannigfaltigen Stufen der Gelatinezersetzung durch verschiedene Bakterien und demnach auch eine gute Basis zur Klassifizierung der Bakterienarten.

Unsere Versuche wurden alle mit Fermenten gleicher Herkunft ausgeführt und die Tyrosinaselösung vor jedem Experiment frisch dargestellt.

## I. Anwendung der Parakresoltyrosinasereaktion zur Unterscheidung der Bakterienarten nach dem Grade der Zersetzung der Gelatine.

In den Kreis der Untersuchungen wurden folgende Bakterienarten gezogen: Bacillus mesentericus panis viscosi (Vogel), Bacillus violaceus Lutiensis (Macé), Bacillus subtilis Ehr. (F. Kohn), Bacterium prodigiosum (Ehrenberg), Bacillus ruber (Zimmermann).

Einige orientierende Versuche zeigten bedeutende Unterschiede in der Zersetzungsgeschwindigkeit durch verschiedene Arten.

Es wurde nun zunächst eine Serie von Experimenten mit stets gleichen Quantitäten des Verflüssigungsproduktes ausgeführt, im Hinblick auf die Intensität der Färbung einerseits und die Geschwindigkeit, mit welcher sich diese Färbung einstellte, andererseits.

Die Parakresollösung hatte eine konstante Konzentration von $^1/_{250} = 0{,}4\,^0/_0$, diejenige des Fermentes enthielt 5 Centigramm pro 10 ccm Wasser $= 0{,}5\,^0/_0$.

Als Vergleichsflüssigkeit wurde in allen Fällen die gleiche Menge in einem Reagenzglase durch Hitze verflüssigter Gelatine verwandt.

Aus der großen Zahl zur Verfügung stehender Versuchsergebnisse greifen wir diejenigen heraus, welche die verschiedene Wirkungsweise der Bakterien an der Hand der Gelatinezersetzungsprodukte am übersichtlichsten demonstrieren.

Versuch I: Bakterienflüssigkeit 10 Tropfen, Parakresol 1 ccm, Ferment 1 ccm, Wasser 1 ccm.

Die Färbung tritt sehr langsam ein; sie ist deutlich wahrnehmbar nach 30 Minuten. Nach 2 Stunden kann man bereits merkliche Intensitätsdifferenzen der Färbung der durch Hitze einerseits und durch

Bakterien andererseits verflüssigten Gelatine bemerken. Nach 3 Stunden kann man überdies die einzelnen Bakterienarten auf kolorimetrischem Wege unterscheiden. Am schnellsten tritt der Farbenübergang bei Bacillus violaceus ein. Bacillus mesentericus und Bacterium prodigiosum zeigen nach der oben erwähnten Zeit die gleiche Färbung. Bei Bacillus subtilis und Bacillus ruber verläuft die Reaktion viel langsamer. Nach Ablauf von 5 Stunden sind die Lösungen des Bacillus violaceus und Bacillus mesentericus gleich gefärbt. Bacterium prodigiosum ist ein wenig heller; es folgen in der Reihe Bacillus subtilis (bedeutend heller) und schließlich Bacillus ruber.

Die Intensität der Färbungen nach 24 Stunden war wie folgt: Bacillus violaceus tiefblau, Bacillus mesentericus violettblau, Bacterium prodigiosum violett mit einem Stich ins Blaue, Bacillus subtilis rot-violett, Bacillus ruber rot. Mit künstlich verflüssigter Gelatine erhält man immer eine ausgesprochen rote Farbe.

Versuch II: Die Versuchsbedingungen sind die gleichen wie bei Versuch I, bis auf die Quantität des Verflüssigungsproduktes:

Bakterienflüssigkeit 6 Tropfen, Parakresol 1 ccm, Ferment 1 ccm, Wasser 1 ccm.

Die Färbung erscheint noch viel langsamer wie bei Versuch I; die Farbe ist am intensivsten bei Bacillus violaceus; hingegen verschwinden die Unterschiede in allen anderen Versuchsgläsern.

Nach 24 Stunden ist das Ergebnis wie folgt:

Bacillus violaceus violett, Bacillus mesentericus rotviolett, Bacterium prodigiosum weinrot, Bacillus subtilis tiefrot, Bacillus ruber hellrot.

Die oben genannten Versuche wurden ausnahmslos mit 21 Tage alten Kulturen ausgeführt. In den nun folgenden Experimenten versuchte man, die Abhängigkeit der zum Erzielen der Blaufärbung notwendigen Minimaldosis des Verflüssigungsproduktes von dem Stadium der Entwickelung der Bakterienart klarzustellen. Man fand, daß die Menge der erforderlichen Flüssigkeit am Anfang der Verflüssigung recht bedeutend und gewissermaßen eine Funktion der Zeit ist. Auch wechselt sie mit der Bakterienart.

Versuch III: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 7-8tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 38 Tropfen, Bacillus mesentericus 26 Tropfen, Bacterium prodigiosum 29 Tropfen, Bacillus subtilis 56 Tropfen, Bacillus ruber 62 Tropfen.

Versuch IV: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 21tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 9 Tropfen, Bacillus mesentericus 10 Tropfen, Bacterium prodigiosum 11 Tropfen, Bacillus subtilis 18 Tropfen, Bacillus ruber 27 Tropfen.

Bei den beiden letztgenannten Arten ist die blaue Farbe nicht ausgesprochen blau.

Versuch V: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 30tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 7 Tropfen, Bacillus mesentericus 9 Tropfen, Bacterium prodigiosum 11 Tropfen, Bacillus subtilis 14 Tropfen, Bacillus ruber 23 Tropfen.

In den beiden letztgenannten Versuchen ist die blaue Farbe nicht ausgesprochen blau.

Versuch VI: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 50tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 4 Tropfen, Bacillus mesentericus 7 Tropfen, Bacterium prodigiosum 10 Tropfen, Bacillus subtilis 10 Tropfen, Bacillus ruber 19 Tropfen.

Versuch VII: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 60tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 3 Tropfen, Bacillus mesentericus 4 Tropfen, Bacterium prodigiosum 8 Tropfen, Bacillus subtilis 7 Tropfen, Bacillus ruber 17 Tropfen.

Versuch VIII: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 70tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 3 Tropfen, Bacillus mesentericus 1 Tropfen, Bacterium prodigiosum 6 Tropfen, Bacillus subtilis 7 Tropfen, Bacillus ruber 17 Tropfen.

Versuch IX: Zur Hervorrufung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis einer 78tägigen Kultur von: Bacillus violaceus 3 Tropfen, Bacterium prodigiosum 6 Tropfen, Bacillus subtilis 7 Tropfen, Bacillus ruber 17 Tropfen.

Diese Experimente genügen wohl zum Beweise der Tatsache, daß die Wirkungskraft der Mikroorganismen gegenüber der Gelatine mit der Bakterienart wechselt. Während sie durch die eine ziemlich schnell bis zu Aminosäuren zersetzt wird (Bacillus violaceus, Bacillus mesentericus), tritt die Desaggregation mittels der anderen nur sehr

langsam und unvollständig ein. Sie ist charakterisiert durch eine meist von der Vergleichsfärbung deutlich verschiedene Rotfärbung, ohne Umschlag ins Blaue. Andrerseits kann man durch passende Auswahl eine ganze Tonleiter von Farbentönen erhalten: rot, weinrot, himbeerrot, violettrot, violett, violettblau, indigoblau und dunkelblau mit fuchsinroter Fluoreszenz.

Die letzte Färbung ist an die Existenz von Aminosäuren, oder vielmehr von Amino-Karboxylgruppen gebunden, die im Laufe der Desaggregation der Proteinstoffe an Menge zunehmen.

**II.** Eine zweite Versuchsreihe hatte zum Zweck die Erforschung des **Einflusses verschiedener Faktoren auf die Peptolyse:**

1. Gegenwart von Zucker in einem Gelatinemilieu (Fleisch oder künstliche Bouillon), 2. Einfluß des Lichtabschlusses, 3. Einfluß der Temperaturerniedrigung.

Die Untersuchungen wurden an Bacillus violaceus durchgeführt. Als Nährboden verwandte man dieses Mal eine künstliche Bouillon mit 2% gewöhnlichen Peptons, $^1/_{10}$ Detmer und 5% Glukose. In erster Linie wurde die zur Erzielung der Blaufärbung erforderliche Minimaldosis bei verschiedenen Entwickelungsstadien bestimmt und die Resultate mit denjenigen verglichen, die wir vorher auf neutralem Raulin mit 10% Gelatine erhalten hatten. Der Versuchszeitpunkt sowie die Quantität der Versuchsflüssigkeit wurden in dieser Serie von Experimenten konstant gehalten, so daß man die Vergleiche auf nur eine einzige Variable — die Farbenintensität — beschränken konnte.

**Abhängigkeit der Farbenintensität vom Milieu.**

Tabelle I.

36 Tropfen einer 8tägigen Kultur von Bacillus violaceus.

| Milieu | Färbung |
|---|---|
| Raulin gelatinisiert | Blau |
| Bouillongelatine | Grünviolett |
| Bouillongelatine — 2 % Glukose | Rotviolett |
| Bouillon ohne Gelatine | Tiefrot |
| Bouillon ohne Gelatine — 2 % Glukose | Tiefrot |

Tabelle II.

9 Tropfen einer 21tägigen Kultur von Bacillus violaceus.

| Milieu | Färbung |
|---|---|
| Raulin gelatinisiert | Tiefblau |
| Bouillongelatine | Violett |
| Bouillongelatine — 2 % Glukose | Violett |
| Bouillon ohne Gelatine | Rot |
| Bouillon ohne Gelatine — 2 % Glukose | Rot |

Tabelle III.

7 Tropfen einer 30tägigen Kultur von Bacillus violaceus.

| Milieu | Färbung |
|---|---|
| Raulin gelatinisiert | Tiefblau |
| Boillongelatine | Blau |
| Bouillongelatine — 2 % Glukose | Violett |
| Bouillon ohne Gelatine | Rotviolett |
| Bouillon ohne Gelatine — 2 % Glukose | Weinrot |

Tabelle IV.

4 Tropfen einer 50tägigen Kultur von Bacillus violaceus.

| Milieu | Färbung |
|---|---|
| Raulin gelatinisiert | Tiefblau |
| Bouillongelatine | Tiefblau |
| Bouillongelatine — 2 % Glukose | Violett |
| Bouillon ohne Gelatine | Schmutzigrot |
| Bouillon ohne Gelatine — 2 % Glukose | Rot |

Tabelle V.

3 Tropfen einer 60tägigen Kultur von Bacillus violaceus.

| Milieu | Färbung |
|---|---|
| Raulin gelatinisiert | Tiefblau |
| Bouillongelatine | Tiefblau |
| Bouillongelatine — 2 % Glukose | Violett |
| Bouillon ohne Gelatine | Schmutzigrot |
| Bouillon ohne Gelatine — 2 % Glukose | Tiefrot |

Man ersieht aus den angeführten Daten, daß die Verschiedenheiten in den Färbungen — welche übrigens nur im Anfangsstadium der Reaktion unterschieden werden können — sich nur bei Verwendung von Gelatinenährboden feststellen lassen, und daß ein gewisser Parallelismus zwischen der Färbung und der Menge der verflüssigten Gelatine existiert.

Man könnte demnach versucht sein, a priori die Existenz eines spezifischen Gelatine-Fermentes — einer **„Gelatinase“** — neben den gewöhnlichen proteolytischen Fermenten anzunehmen.

Ferner sehen wir, daß bei Gegenwart von **Zucker** — welch letzterer die Verwendung der Glykoproteide überflüssig macht — die Gelatine nur in dem Maße angegriffen wird, wie diese zugänglichste Ernährungsquelle erschöpft wird. Man hat Grund zu der Annahme, daß die gesamte Gelatine intakt bliebe, falls der Zucker in einer für die Ernährung der Bakterien ausreichenden Quantität vorhanden wäre. Analoge Ergebnisse sind übrigens wiederholt zitiert worden für Staphylococcus pyogenes

aureus, Bacterium prodigiosum und andere, die ihren Nährboden nur teilweise angreifen, und für Bacillus anthracis und Spirillen, welche ihn ganz unberührt lassen.

Im Falle eines gelatinefreien Milieus wird die Reaktionsintensität durch die Abwesenheit des spezifischen Gelatinefermentes stark herabgedrückt. Wir erhalten alsdann nur die für die erste Stufe der Reaktion charakteristische Rotfärbung der Polypeptide.

Der Abschluß vom **Licht** ist von ganz geringem Einfluß auf die Resultate. Die Blaufärbungen unterscheiden sich in diesem Falle nur durch einen schwachen violetten Reflex.

Bei **tiefen Temperaturen** ist die Entwickelung sehr verzögert und oft war es uns sogar unmöglich, aus den Versuchen vergleichende Schlüsse zu ziehen.

## III. Parakresol-Tyrosinase als Reagens auf Indol bei bakterieller Fermentation.

Die Parakresol-Tyrosinase reagiert sehr lebhaft mit Indol unter Bildung einer grünblauen Färbung, die mit der Zeit stärker wird, und eines charakteristischen blauen Schaumes[1]). Die Bildung dieses Schaumes hängt von der Konzentration der Indollösung ab. Wir haben die Empfindlichkeit dieser Reaktion einer systematischen Prüfung unterzogen, indem wir versucht haben: 1. mit Hilfe der Reaktionsgeschwindigkeit die quantitativen Beziehungen zwischen p-Kresol und dem Indol aufzuklären, 2. die Minimumkonzentration für die Reaktion zu bestimmen, 3. durch Vergrößerung der angewandten Mengen Kresol resp. des Fermentes den Farbstoff in zur Ätherextraktion genügender Quantität zu produzieren, 4. über den Einfluß der Temperatur auf die Reaktion Klarheit zu schaffen, 5. die Wirkung eines Zusatzes von Alkalien zu verfolgen, 6. das p-Kresol durch o- und m-Kresol zu ersetzen (wobei übrigens nur negative Resultate erzielt wurden) und schließlich 7. mittels unseres Reagens das durch Einwirkung von Bakterien auf ein peptonreiches Milieu gebildete Indol quantitativ zu bestimmen.

Als Ausgangsprodukt diente eine kaltgesättigte Lösung von Indol, welche ungefähr 0,27 % Indol enthielt. Zunächst mußte das Verhältnis zwischen Indol — welches hier als Aminosäure fungierte — und dem obengenannten Reagens festgestellt werden. Zu diesem Zwecke vermehrte man progressiv die Indollösung und bestimmte auf diese Weise

[1]) R. Chodat, Archives Sc. phys. et nat. IV^e, **33**, 1912, 245.

die Quantität, bei welcher die lebhafteste Reaktion eintrat. Das p-Kresol und die Tyrosinase wurden in denselben Quantitäten verwandt, wie zur Bestimmung der Aminosäuren ($^1/_{250}$ p-Kresol-Lösung und 0,25 Tyrosinase-Lösung).

Man fand mit Hilfe des oben angeführten Fermentes, daß der für Indol charakteristische blaue Schaum nur in gewisser Minimalkonzentration eintritt, sich alsdann proportional der Konzentration verstärkt (Optimum) und in dem Augenblick verschwindet, wo die Konzentration die obere Grenze (Maximum) überschritten hat.

Versuch I: 1 ccm p-Kresol, 1 ccm Indol, 1 ccm Tyrosinaselösung. Die Reaktion erfolgt sehr langsam (1—2 Stunden), schwache Färbung, keine Schaumbildung.

Versuch II: 1 ccm p-Kresol, 1,5 ccm Indol, 1 ccm Tyrosinaselösung. Reaktionsbeginn nach der gleichen Zeit; stärkere Färbung, bläulicher Schaum.

Versuch III: 1 ccm p-Kresol, 2 ccm Indol, 1 ccm Tyrosinaselösung. Die Reaktion erfolgt innerhalb 30 Min.—1 Stunde. Schwach oliv-grüne Färbung; charakteristischer blauer Schaum.

Versuch IV: 1 ccm p-Kresol, 2,5 ccm Indol, 1 ccm Tyrosinaselösung. Gleiche Zeit; die Farbe der Lösung nimmt einen Stich ins Gelbe an. Schaum schwach gefärbt.

Versuch V: 1 ccm p-Kresol, 3 ccm Indol, 1 ccm Tyrosinaselösung. Lösung gelblich; Schaum beinahe farblos.

Versuch VI: 1 ccm p-Kresol, 3,5 ccm Indol, 1 ccm Tyrosinaselösung. Lösung gelb bis braun; Schaum farblos.

Tabelle VI.

Versuche zum Vergleich der Empfindlichkeit der Indolreaktion.

| 2 ccm Indol<br>1 ccm p-Kresol<br>1 ccm Tyrosinase | 2 ccm Indol<br>2 ccm p-Kresol<br>1 ccm Tyrosinase | 2 ccm Indol<br>1 ccm p-Kresol<br>2 ccm Tyrosinase |
|---|---|---|
| Die Reaktion tritt ziemlich langsam ein. Sie beginnt nach 30 Minuten und erreicht ihr Maximum nach 1 Stunde. | Die Reaktion verläuft viel schneller. Nach 20 Minuten tiefgrüne Färbung u. blauer Schaum. | Reaktion noch viel lebhafter. Bereits nach 15 Minuten schon olivgrüne Färbung und blauer Schaum in großer Menge. |

Wie man sieht, liegt das Optimum für die hier gewählte Indolkonzentration bei 2 ccm.

Bei Durchsicht dieser kleinen Versuchsreihe findet man, daß man zur Verstärkung der Reaktionsempfindlichkeit entweder die Menge des p-Kresols, oder diejenige des Fermentes vergrößern kann. Bei allen folgenden Untersuchungen haben wir uns des zweiten Mittels bedient, um die Empfindlichkeit der Reaktion zu steigern. Alsdann konnten wir durch progressive Verminderung der Indolmenge die Grenzkonzentration festsetzen.

Tabelle VII gibt eine Übersicht über die hierbei erhaltenen Resultate.

## Tabelle VII.

Empfindlichkeit der Reaktion als Funktion der Indolkonzentration.

| Indolkonzentration in % | Intensität der Reaktion |
|---|---|
| 0,27 | Recht lebhafte Reaktion mit blauem Schaum |
| 0,137 | Deutliche Färbung mit reichlicher Schaumbildung |
| 0,0625 | " " " " " |
| 0,0337 | " " " " " |
| 0,0148 | Reaktion schwächer. Schaum hell mit bläulichem Reflex |
| 0,0074 | Keine Schaumbildung; ätherische Lösung lebhaft rosa |
| 0,0037 | Keine Schaumbildung; ätherischer Auszug schwach gefärbt |

Als Ausgangspunkt wurde eine gesättigte Indollösung verwandt. In den Fällen, wo die Indolkonzentration ausreichend war, beurteilte man die Intensität der Reaktion nach der Menge des blauen Schaumes und der Stärke der Färbung. Waren die Lösungen hingegen arm an Indol, so schüttelte man den gebildeten Farbstoff in einem Scheidetrichter mit Äther aus. Die ätherische Lösung nimmt nämlich sofort eine schwache oder lebhafte Rosafärbung an, je nachdem mehr oder weniger Indol vorhanden ist. Siehe auch Tabelle VII. Es gelang uns — nicht ohne Mühe —, den Farbstoff aus der ätherischen Lösung zu isolieren, indem wir den Äther in einem Luftstrome oder im Vakuumexsikkator recht schnell verdampften. Der auf die geschilderte Art gewonnene Farbstoff ist eine intensiv blaue, amorphe Substanz, die in Alkohol unter Violettfärbung sehr leicht, in Benzol dagegen sehr wenig löslich ist. Alkalien lösen dieselbe mit gelber Farbe, welche durch Säuren in ein schönes Grün übergeht.

Ohne auf die Einzelheiten der chemischen Operationen (wie Reduktion und Oxydation) einzugehen, welche uns Identifizierung dieses Körpers ermöglicht hätten, die uns aber von unserem eigentlichen Thema abgelenkt hätten, wandten wir uns dem Studium des Einflusses der Temperatur auf den Reaktionsverlauf zu.

Bei verschiedenen Temperaturen ausgeführte Vergleichsversuche zeigen deutlich, daß die Farbstoffbildung durch Temperaturerniedrigung begünstigt wird; Tafel VIII demonstriert diese Tatsache.

Dies ist in vollster Übereinstimmung mit den Beobachtungen an allen Chinolinfarbstoffen und kann in der Tatsache eine Erklärung finden, daß man auf diese Weise die Oxydation des Chinolinkernes nach Möglichkeit einschränkt.

Tabelle VIII.

Der Einfluß der Temperatur auf die Indolreaktion.

| 1. 20° | 2. 15° | 3. 10° | 4. 5° | 5. 0° |
|---|---|---|---|---|
| Färbung erscheint nach 20 Minuten, wird rasch dunkler. Nach etwa 30 Minuten blauer Schaum | Keine deutliche Verschiedenheit im Reaktionsverlauf | Färbung nach 25 Minuten, dunkelt weniger schnell nach, erreicht erst nach 1 Stunde die Intensität von 1. und 2.; wird schließlich noch dunkler | Schwache Färbung nach 25 Minuten, dunkelt langsam nach, dagegen nimmt die Intensität immer mehr zu. Nach 1 Stunde tief dunkelgrüne Flüssigkeit mit stark gefärbtem dicken Schaum | Färbung sehr verzögert, erscheint erst nach 40 Minuten, dunkelt sehr langsam nach; erreicht sein Maximum erst nach $1\frac{1}{2}$ Stunden |

In den beiden letzten Fällen übersteigt die Intensität der Färbung bei weitem alle durch die vorigen Experimente erzielte.

Hierauf wurden die Versuche in Gegenwart von Alkalien wiederholt. Nach Chodat[1]) reagiert nämlich die Tyrosinase am besten in neutralen Lösungen und ist sehr empfindlich gegen Säuren, daher wollten wir sehen, ob bei Anwendung von Indol die Reaktion ebenso verläuft, wie mit Glykokoll oder einer anderen Aminosäure, und verwandten als Base eine $\frac{n}{10}$-Lösung von Natriumkarbonat. Indem wir die Menge des Alkalis allmählich steigerten, konnten wir nachweisen, daß die Reaktion

[1]) R. Chodat, a. a. O.

bei Anwesenheit geringer Quantitäten von Basen ($^{1}/_{2}$ ccm) in normaler Weise verläuft, durch größere Mengen (1 ccm) sehr geschwächt und schließlich gänzlich verhindert wird (2 und 3 ccm).

Endlich haben wir unser Reagens zur quantitativen Bestimmung des Indols angewandt, welches durch Zersetzung von Tryptophan und von Tyrosin unter der Wirkung von Mikroorganismen in einem geeigneten Milieu erzeugt wird.

Wie bekannt, werden zur Klassifikation der Bakterien nach Kitasato[1]) und Lewandowski[2]) die Zersetzungsprodukte der aromatischen Kerne zu Hilfe gezogen, indem man die Bakterien einteilt in: 1. Indol-, Skatol- und Phenol-Produzierende, wie das Bacterium der Haemorrhagie, 2. Indol-, aber nicht Phenol-Produzierende, wie der Tuberkelbazillus, Actinomyces, 3. Bakterien, die weder Indol, noch Skatol, noch Phenol produzieren, wie Bacillus typhi, Bacillus paratyphi, Bacillus aerogenes.

Der praktische Wert dieser Klassifikation ist durch Versuche mit gewissen anderen Bakterien zweifelhaft geworden, denn — wenn man auch die Widersprüche in den Angaben von Blumenthal[3]), Tissier und Martelly[4]), Lehmann und Neumann[5]) bezüglich des Bacillus coli durch die Tatsache erklären kann, daß man recht verschiedene Bakterien unter den gleichen Namen oft verwechselt hat — Bacillus coli, Bacillus coli anindolicus, so kann man andererseits die Resultate der Arbeiten von Morris[6]) nicht übersehen, wonach so gut charakterisierte Bakterien wie Bacillus typhi, Bacillus murisepticus, Bacillus cyanogenes oder Bacillus pyocyaneus, Bacillus violaceus und Bacillus anthracis, welche man bekanntlich früher als nicht indolproduzierend angesehen hatte, mehr oder weniger lebhafte Indolreaktionen geben.

In Übereinstimmung mit den Angaben von Morris, gelang es uns bei Anwendung eines 5prozentigen Pepton-Nährbodens die Bildung von Indol mit Hilfe unseres Reagens nachzuweisen (Angesichts der speziellen Arbeits-Methoden unseres Laboratoriums mußten wir hierbei vor allem darauf bedacht sein, die Einführung pathogener Bakterien zu verhindern).

---

1) Kitasato, Zeitschrift für Hygiene, 7, 1889.
2) Lewandowski, Deutsche Med. Wochenschr, 1890.
3) Blumenthal, Zeitschrift für klin. Medizin, **28**, 1895, 241.
4) Tissier und Martelly, Zeitschrift für klin. Medizin, 1895.
5) Lehmann und Neumann, Grundriß der Bakteriologie, 1904.
6) Morris, Archiv für Hygiene, **30**, 1897.

Bevor wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen in Kürze zusammenstellen, möchten wir noch die Aufmerksamkeit auf den Umstand lenken, daß die bis jetzt bekannten und gebrauchten Methoden zur Identifizierung von Indol wenig zuverlässig sind und keine übereinstimmenden Resultate geben. Dies ist der Grund, weshalb man die eigentümlichen Befunde von Selter[1]) anläßlich seiner interessanten Arbeit über Bacillus pseudodyssenteriae ebensogut auf Rechnung der Variabilität der in Frage kommenden Bakterienart, als auch der Unvollkommenheit der gebrauchten kolorimetrischen Methode zuschreiben darf.

Neben der neuerdings mit gutem Erfolg durch Böhme[2]), Marshall[3]) und Crossonini[4]) angewandten Reaktion von Ehrlich (4 g Paradimethylamidobenzaldehyd in 380 ccm 96prozentigem Alkohol, konzentrierte Salzsäure und eine wässerige Lösung von Kaliumsulfat) werden zur Bestimmung geringer Mengen Indol die Methoden von Legal oder von Salkowski[5]) gebraucht.

Nach Legal verwendet man eine Lösung von Nitroprussidnatrium, welche man mit einigen Tropfen NaOH-Lösung versetzt. Bei Anwesenheit von Indol entsteht eine violettblaue Färbung, die durch HCl in ein schönes Blau verwandelt wird.

Salkowski bedient sich einer 2prozentigen Lösung von Kaliumnitrit zur totalen Fällung des Indols aus wässeriger Lösung in Gegenwart von rauchender Salpetersäure (Nencki) als Nitrosoindolnitrat.

Der bakterielle Abbau von Tryptophan und Tyrosin zu Indol, wie er gewöhnlich im Eiweiß-Milieu beobachtet wird, liefert derart geringe Mengen Indol, daß dieselben bei Gegenwart selbst kleiner Quantitäten von Zucker nicht nachgewiesen werden können. Zur Erzielung guter Resultate muß man daher die Peptonmenge übermäßig steigern — nachgewiesenermaßen eignet sich am besten eine 8—15tägige Kultur mit 10% Pepton.

Im Gegensatz dazu fällt unser Reagens auch aus sehr indolarmen Lösungen einen in Äther löslichen Farbstoff, der noch in Verdünnungen von 0,0037% identifiziert werden kann, und eignet sich somit ganz vorzüglich zum Nachweis der Spuren von Indol, die als Folge der Eiweißverdauung auftreten, umsomehr als sein oben erwähntes indifferentes Verhalten zu Skatol eine Trennung der beiden Zwillingssubstanzen erlaubt.

---

1) Selter, Centralbl. f. Bakt.. **51**, 1909, auch Kemp u. Metz.

2) Böhme, Centralbl. f. Bakt., **40**, 129.

3) Marshall, Journal of Hyg., **5**, 1907, 581.

4) Crossonini, Archiv für Hygiene, **72**, 1910.

5) Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 8, 447

Mit seiner Hilfe ist es gelungen, die Bildung von Indol bei Bacillus violaceus und Bacillus pyocyaneus nachzuweisen. Versuche mit Bacillus subtilis und Staphylococcus pyogenes aureus haben dagegen zu keinem positiven Ergebnis geführt.

Weitere Untersuchungen sind im Gange.

## Bibliographie.

1. Benecke, Bau und Leben der Bakterien. — 2. Berghaus u. Naviasky, Arch. f. Hyg., 1908. — 3. Bitter, Arch. f. Hyg., **5**, 1886. — 4. Bienstock, Arch. f. Hyg., **36**, 346. — 5. Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Med, **28**, 1895, 241. — 6. Böhme, Centrbl. f. Bakt., **40**, 129. — 7. Cacace, Centralbl. f. Bakt., **30**, 1901, 244. — 8. Chodat, Nouv. rech. sur. ferm. oxyd. Arch. Sc. ph. et nat., 1907. — 9. Chodat, Nouv. rech. sur ferm. oxyd. Arch. Sc. ph. et nat., 1911. — 10. Chodat, Archives Sc. phys. et nat. IVe, **33**, 1912, 245. — 11. Chodat und Schweizer, Über die desamidierende Wirkung der Tyrosinase. Biochem. Ztschr., **57**, 1913, 430. — 12. Czapek, Zeitschr. f. Biol., **57**, 1. — 13. Crossonini, Arch. f. Hyg., **72**, 1910. — 14. Delezenne und Breton, Comp. rend. soc. biol., 1904. — 15. Duclaux, Mémoires sur le lait, Ann. de l'Institut nat. agronomique 1882; Id. Le lait. Paris, 1894; Id. Traité de Microbiologie, Paris, 1899, II, 610. — 16. Eickmann, Centrbl. f. Bakt., **29**, 1901, 22. — 17. Emmerling, Ber. D. chem. Ges., 1902, 700. — 18. Fermi, Arch. f. Hyg., **10**, **12**, **14**. — 19. Kalischer, Arch. f. Hyg., **37**, **48**, 1900. — 20. Kitasato, Zeitschr. f. Hyg., **7**, 1889. — 21. Kruse, Allgem. Mikrobiol., Leipzig, 1910. — 22. Lewandowski, Deutsch. Med. Wochenschr., 1890. — 23. Lehmann und Neumann, Grundriß der Bakt., 1904. — 24. Liborius, Zeitschr. f. Hyg., **1**, 1886. — 25. Marshall, Journ. of Hyg., 1907, 581. — 26. Morris, Arch. f. Hyg., **30**, 1897. — 27. Macé, Traité prat. de Bacteriol. Paris, 1904. — 28. Pfaundler, Centrbl. f. Bakt., **31**, 1902, 113. — 29. Rettger, Amer. Journ. of Physiol., 8, 1903, 284. — 30. Ritter, Arch. f. Hyg., **5**, 1886. — 31. Salkowski, Zeitschr. f. Physiol. Chem., 8, 447. — 32. Sternberg, Baumgart. Jahresber., 1887. — 33. Tissier und Martelly, Zeitschr. f. klin. Med., **28**, 1895. — 34. de Waale und Vandevelde, Centrbl. f. Bakt., **39**, 1905, 353. — 35. Wehmer, Die Pflanzenstoffe.

# Referate.

**Löhnis, F.** und **Green, H. H. Über die Entstehung und die Zersetzung von Humus, sowie über dessen Einwirkung auf die Stickstoff-Assimilation.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **40**, 1914, S. 52—60.

Stalldünger, Gründünger, Stroh, Torf und Zucker wurden (vermischt mit der 10fachen Menge Sand) unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen 5 Monate lang der Humifizierung überlassen. Am kräftigsten ging der Prozeß bei gemäßigtem Luftzutritt vonstatten. Die durch Extraktion mittels Salzsäure und Alkali gewonnenen Humuspräparate wurden in Erde innerhalb von 5 Wochen in folgendem Umfange ($^0/_0$ des Gesamt-Stickstoffs) nitrifiziert:

| | Stallmist | Gründünger | Torf | Stroh |
|---|---|---|---|---|
| frische Substanz . . | 0,4 | 27,5 | 2,8 | 0 |
| aerob humifiziert . . | 14,2—16,3 | 14,0—18,5 | 3,2—3,8 | 0 |
| anaerob „ . . | 11,2—12,1 | — | 2,9—3,9 | 0 |

Auf die Stickstoffbindung durch Azotobacter wirkten sämtliche Humuspräparate ziemlich gleich fördernd ein. Verstärkte O- und N-Adsorption war hierfür nicht verantwortlich zu machen. Es scheinen, wie im Erdextrakt, in erster Linie lösliche Substanzen von Bedeutung zu sein. Löhnis.

**McBeth, J. G.** and **Smith, N. R. The influence of irrigation and crop production on soil nitrification.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **40**, 1914, S. 24—51, m. 6 Fig.

Auf sehr kalkreichem, feinsandigem, nicht gedüngtem Boden verminderte die Bewässerung die Nitrifikations-Intensität. Diese war unter Luzerne am höchsten, danach folgten Hafer, Kartoffeln und Mais; am wenigsten Salpeter entstand im Brachland. 90 $^0/_0$ des Nitrats wurden in der obersten, 6—12 Zoll starken Erdschicht gebildet. In 5 Fuß Tiefe war nur noch eine sehr schwache Nitrifikation nachweisbar. Die Feuchtigkeit der nicht bewässerten Teilstücke war während des Sommers bei weitem nicht optimal, gleichwohl nitrifizierte diese Erde am stärksten. Löhnis.

**Vogel von Falckenstein, K. Über Nitratbildung im Waldboden.** Internat. Mitt. f. Bodenkunde **3**, 1913, Heft 6 (S.-A.).

Mehrere Waldböden zeigten ziemlich kräftige Nitrifikation. Namentlich die Reste der Streudecke erwiesen sich als leicht zersetzlich, als sehr resistent

dagegen der alte Humus in schwarzem Sande. In kalkreichen Tonböden wurden innerhalb eines Jahres 3—6 % des Gesamt-Stickstoffs mineralisiert. In kalkarmen Sandböden war die Umsetzung geringer. Nur in kalkreichen Erden bleiben die älteren Humusstoffe (infolge Sättigung mit Kalk) abbaufähig. Bei Kalkmangel kommt es zur „Vertorfung“. Neben Kalkung wirkt eine oberflächliche Lockerung der Streudecke sehr fördernd auf die Salpeterbildung ein. Löhnis.

**Brown, P. E. Bacteriological studies of field soils. III. The effects of barnyard manure.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **39**, 1913, S. 523—542.

Fünf Parzellen auf schwerem Lehmboden wurden mit verschiedenen Mengen Stallmist (0, 8, 12, 16 resp. 20 Tonnen pro acre) gedüngt. Zwischen 2. August und 9. September wurden 4 Erdproben entnommen und in bezug auf Keimzahl (auf Albumin-Agar), Ammoniakbildung (aus Casein, Albumin und Blutmehl) und Nitrifikation (von Ammonsulfat) untersucht. Die erhaltenen Resultate stimmten sowohl unter sich wie mit den Ernte-Ergebnissen gut überein. Z. B. ergab sich für die Probe vom 2. August:

| Düngung | 0 | 8 | 12 | 16 | 20 tons pro acre | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Keimzahl pro ccm . . . | 3,15 | 3,56 | 3,89 | 4,05 | 3,74 | Millionen |
| $NH_3$ aus Casein . . . . | 37,87 | 46,89 | 51,79 | 51,99 | 48,78 | mg N |
| $N_2O_5$ aus Ammonsulfat . . | 5,58 | 7,26 | 8,47 | 10,28 | 8,13 | „ „ |
| Mais, Bushel per acre . . | 50,50 | 77,62 | 86,00 | 87,00 | 81,00 | |

Der durch die stärkste Düngung verursachte Rückgang von Keimzahl, Stickstoffumsetzung und Ernte-Ertrag beruht nicht auf Denitrifikation, die weder in Lösung noch in Erde nachzuweisen war. Löhnis.

**Kellermann, K. F., McBeth, J. G., Scales, F. M. and Smith, N. R. Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **39**, 1913, S. 502—522, m. 2 Taf.

Die Gewinnung von Reinkulturen Zellulose-lösender Bakterien erfolgt besser als auf Zellulose- auf Stärkeagar. Die Aufhellungszone kann hier durch Übergießen mit 95proz. Alkohol deutlich sichtbar gemacht werden. Zuweilen schlagen indessen alle Isolierungsversuche fehl. Offenbar handelt es sich in solchen Fällen um so enge Symbiosen, daß eine Trennung der beteiligten Organismen einstweilen nicht möglich ist. 13 neue Arten sporenfreier stäbchenförmiger Zellulose-Zersetzer sowie mehrere Varietäten bereits früher aufgefundener Spezies werden beschrieben und z. T. abgebildet. Am Schluß folgt eine übersichtliche Zusammenstellung der biochemischen Charaktere und ein Bestimmungsschlüssel. Löhnis.

**Krainsky, A. Zur Frage der Zellulose-Zersetzung durch Mikroorganismen.** Russ. Journ. f. exp. Landw. **14**, 1913, S. 255—261, m. 7 Abb. [russisch mit deutscher Zusammenfassung].

Die benutzte Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 0,1—2 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % $K_2HPO_4$, 0,1 % NaCl, 0,2—0,3 % $MgCO_3$, 0,04 % $FeSO_4$.

Das Papier blieb z. T. außerhalb der Flüssigkeit. Geimpft wurde mit Erde. Es entstanden verschiedenfarbige, namentlich schwarze und rosa Flecken. Die hieraus isolierten Mikroben werden als Actinomyces melanocyclus und A. alboroseus beschrieben. Jener ist identisch mit Märckers Microc. melanocyclus[1]). Löhnis.

**Pringsheim, H. Über die Vergärung der Zellulose durch thermophile Bakterien.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **38**, 1913, S. 513—516, m. 1 Abb.

Durch thermophile Anaerobe wird neben $CO_2$ und H fast nur Essig- und Ameisensäure gebildet. Eine Spur Milchsäure war gleichfalls nachweisbar; dagegen fehlte die bei niederer Temperatur regelmäßig auftretende Buttersäure gänzlich. Ca. 45 $^0/_0$ der Zellulose lieferten ein aus 5 Teilen Essig- und 1 Teil Ameisensäure bestehendes Säuregemisch. Das Verhältnis zwischen $CO_2$ und H schwankte sehr; es konnte bisher nur mit gereinigten Anhäufungskulturen gearbeitet werden. Die benutzte Apparatur ist (S. 514) abgebildet. Löhnis.

**Viehöver, A. Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien mit besonderer Berücksichtigung der speziesdiagnostisch verwertbaren Merkmale und des Vermögens der Harnstoffspaltung.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **39**, 1913, S. 209—359, m. 2 Taf. und 22 Textfig.

Eine größere Zahl teils selbst isolierter, teils aus anderen Sammlungen bezogener Stämme sporenbildender Harnstoffbakterien wurde einer eingehenden Untersuchung unterworfen. Speziell handelte es sich um Varietäten des Bac. Pasteurii (Miq.) Mig. Die bisherigen Befunde werden in allen Hauptpunkten bestätigt, gleichwohl aber ein ganz neuer Arten-Name: Bac. probatus A. M. et Viehöver eingeführt.

Die sehr ausführliche Arbeit bringt nicht wenige interessante Einzelheiten; Interessenten seien auf das Original verwiesen. Sehr unwahrscheinlich ist nach Ansicht des Ref. die Angabe (S. 272), daß die genannte Art, sogar bei Luftabschluß, Ammoniak in Nitrit verwandeln soll. Auch die für eine autotrophe Lebensweise angeführten Befunde (S. 253) bedürfen entschieden einer eingehenderen Prüfung. Löhnis.

**Münter, F. Über Stickstoffumsetzungen einiger Aktinomyzeten.** II. Mitteilung. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **39**, 1914, S. 561—583, m. 3 Fig.

Das Verhalten der schon früher geprüften Kulturen (Actinomyces odorifer, chromogenes, albus I und II, S a, S b und S c) wurde weiter studiert. Die Ammoniakbildung war am stärksten, wenn Kasein gegeben wurde; geringer bei Leim-, schwach bei Pepton- und sehr schwach bei Hornmehl-Zusatz. Zimmertemperatur wirkte am günstigsten. Der Ammoniak-Verbrauch

---

[1]) Vergl. hierzu auch die betreffenden Angaben in Mütterleins Dissertation Leipzig 1912.

(oder wie Verf. sagt, die „Ammoniak-Zersetzung“) wurde in Ammonsulfat-Glyzerin-Zucker-Lösung geprüft. 10—20 % wurden assimiliert. Außerdem soll auch eine teilweise Nitrifikation stattgefunden haben; die betreffenden Zahlen bewegen sich zwischen 0,1—0,5 mg (!). Zeolith-Beigabe scheint die Assimilation begünstigt zu haben. Salpeter wurde gleichfalls assimiliert, aber nicht reduziert. Stickstoff-Bindung war in Glyzerin-Dextrose-Lösung nicht zu konstatieren. Löhnis.

**Cunningham, A.** and **Löhnis, F. Studies on soil protozoa. I. The growth of protozoa on various media and the effect of heat on active and encysted forms.** Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **39**, 1914, S. 596—610.

Von den verschiedenen geprüften Substraten gaben Blutmehl-, Giltay-, Mannit-Lösung und Erdextrakt die besten Resultate. Nach Impfung mit Erde kamen zuerst Flagellaten und Ciliaten zur Entwicklung, später Amoeben. Das Wachstum der Bakterien und Protozoen zeigte große Übereinstimmung; diese folgen jenen in nur geringem zeitlichen Abstande. Erhitzung wirkte auf die Erdprotozoen in folgender Weise ein:

| Tötungs-Temperatur | Flagellaten | Ciliaten | Amoeben |
|---|---|---|---|
| für aktive Formen . . . | 44° C | 54° C | 48° C |
| für encystierte Formen . | 70—72° C | 72° C | 72° C |

Voraussichtlich gestattet die differente Thermoresistenz, direkt festzustellen, ob die Protozoen in einer Erdprobe in aktiver oder in encystierter Form vorhanden sind. Löhnis.

**Ramm, E. Zur Frage der Impfung bei Neukulturen auf Hochmoor.** Ill. landw. Ztg. **33**, 1913, S. 597.

Weil in einem Falle Salpeter-Düngung (2 dz pro ha) eine kräftige Knöllchen-Entwicklung beim ersten Anbau auf neukultiviertem Lande zur Entstehung kommen ließ, wird diese Maßnahme allgemein an Stelle der Impfung mit Erde oder mit Kulturen empfohlen (!). Die Stickstoffdüngung soll die Leguminosen in den Stand setzen, die Knöllchenbakterien aufzunehmen. Löhnis.

**Domratschewa, F. A. Die Anwendung der bakteriellen Röste des Leines zur Bestimmung der Faser und der Schäbe in Leinstengeln.** Russ. Journ. f. exp. Landw. **14**, 1913, S. 155—166 [russ. m. deutsch. Zusammfssg.].

Kleine Leinbündel werden in mit Wasser gefüllten Reagenzgläsern sterilisiert und mit Reinkulturen geimpft. Die Prüfung kann eventuell für Zuchtzwecke von Wert sein. Löhnis.

# Register der Personennamen.

# Alphabetisches Sachregister.

Buchdruckerei E. Buchbinder (H. Duske) Neuruppin.